

BEST AVAILABLE COPY

PCT/CN03/00847

证 明

REC'D 25 NOV 2003

WIPO

PCT

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日: 2003 07 16

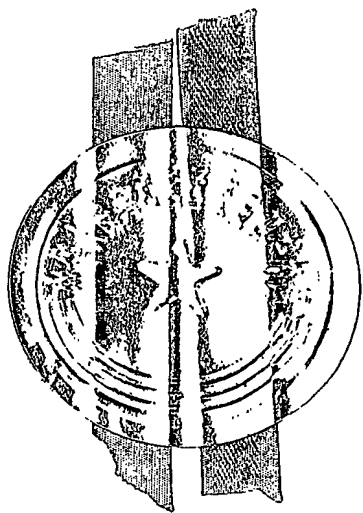
申 请 号: 03 1 38817.5

申 请 类 别: 发明

发明创造名称: 微波降解的甲壳低聚糖化合物及其制备方法

申 请 人: 中国科学院海洋研究所

发明人或设计人: 李鹏程; 邢荣娥; 刘松; 于华华



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

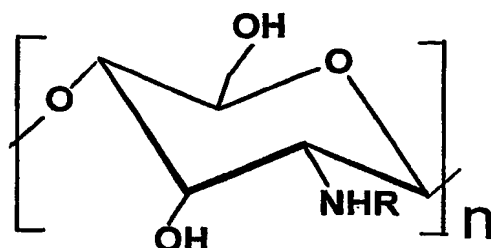
中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 荣 川

2003 年 10 月 22 日

权利要求书

1、一种微波降解的甲壳低聚糖化合物，其特征在于：其是由微波辐射能在电解质存在下，降解壳聚糖制成的甲壳低聚糖化合物，该化合物的典型结构式为：



其中 n 为聚合度， $n=3\sim 150$ ， $R=H$ 或 Ac ，分子量在 $600\sim 30000D$ 之间。

2、根据权利要求 1 所述微波降解的甲壳低聚糖化合物的制备方法，其特征在于：所述的甲壳低聚糖是在电解质作用下微波降解制成的，其中制备步骤如下：

(1) 称取定量的壳聚糖粉末；

(2) 按 1: 20~50 重量倍的比例，向称量的壳聚糖加入电解质溶液，将称量的壳聚糖溶解成粘稠液体；

(3) 将该粘稠液体，搅拌均匀，封盖后放于微波炉中，再在一定的微波辐射能加热反应数分钟；

(4) 再将该反应物用 $2N$ 的 $NaOH$ 液中和至中性，析出淡黄色絮状沉淀物，再在 $4^{\circ}C$ 冷藏柜中沉化；

(5) 将上述沉化的淡黄色絮状沉淀物进行抽滤，将所得滤饼在 $60^{\circ}C$ 下烘干；

(6) 将烘干物粉碎至 20~100 目，进行分子量测定，取分子量在 $600\sim 30000D$ 之间的甲壳低聚糖作为甲壳低聚糖化合物的成品。

3、根据权利要求 2 所述微波降解的甲壳低聚糖化合物的制备方法，其特征在于：所述的 (2) 中的电解质溶液，其是在稀酸中加入适量的电解质制成含电解质的酸溶液。

4、根据权利要求 3 所述微波降解的甲壳低聚糖化合物的制备方法，其特征在于：所述的电解质，是： $NaCl$ 或 KCl 或 $CaCl_2$ 。

5、根据权利要求 2 所述微波降解的甲壳低聚糖化合物的制备方法，其特征在于：所述的 (3) 中微波辐射能量为 $480\sim 800W$ 。

6、根据权利要求 2 所述微波降解的甲壳低聚糖化合物的制备方法，其特征在于：

所述的(3)中含电解质的酸溶液中,用微波辐射降解壳聚糖的反应时间为3~12min。

7、根据权利要求2所述微波降解的甲壳低聚糖化合物的制备方法,其特征在于:所述的(3)~(6)步骤中含电解质的酸溶液中,用微波辐射降解壳聚糖的所得产物的分子量,其与电解质的酸溶液、微波辐射能量和时间三者之间有如下关系:

①在NaCl+稀酸溶液、微波辐射能量480~800W和时间3~12min的作用下所得产物的分子量范围为: $2.01 \times 10^4 \sim 9.14 \times 10^3 D$;

②在KCl+稀酸溶液、微波辐射能量480~800W和时间3~12min的作用下所得产物的分子量范围为: $1.87 \times 10^4 \sim 6.02 \times 10^3 D$;

③在CaCl₂+稀酸溶液、微波辐射能量480~800W和时间3~12min的作用下所得产物的分子量范围为: $1.65 \times 10^4 \sim 4.79 \times 10^3 D$;

④在稀盐酸溶液、微波辐射能量480~800W和时间3~12min的作用下所得产物的分子量范围为: $4.63 \times 10^5 \sim 2.01 \times 10^5 D$;

⑤在稀醋酸溶液、微波辐射能量480~800W和时间3~12min的作用下所得产物的分子量范围为: $4.73 \times 10^5 \sim 2.04 \times 10^5 D$ 。

说明书

微波降解的甲壳低聚糖化合物及其制备方法

(一) 技术领域

本发明涉及甲壳低聚糖的制备技术的改进，具体讲是微波降解的甲壳低聚糖化合物及其制备方法。其属于海洋化工工程技术领域。

(二) 背景技术

众所周知，寡糖、低聚糖具有多种生物功能，其在抗癌药物、诊断试剂、植物生理、食品、化妆品等方面用途广泛，开发应用前景十分广阔。而且其与甲壳质和壳聚糖相比，具有十分突出的优点，如易溶于水、无抗原性，以及它们在宿主体内具有较弱的积累效应等。但目前由于寡糖、低聚糖的制备技术的繁杂和作用机制的研究尚不清楚，使得其价格十分昂贵。由此，寡糖、低聚糖在规模化应用上，就受到很大程度的限制。其主要原因就是寡糖、低聚糖的制备技术和作用机制的研究尚不够深入。这与我国丰富的甲壳质资源显然是不相称的。

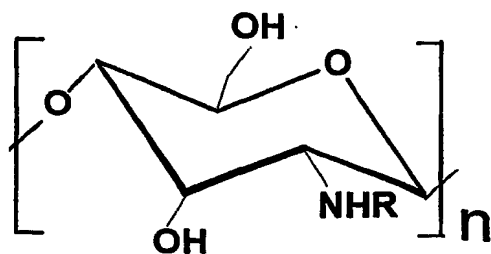
众所周知，降解甲壳质、壳聚糖是制备寡糖、低聚糖的主要手段，但目前所应用的方法如酸降解，氧化降解，超声波降解等得到的产品产率低，大约在 10%~50%。而且重复性差，也就是所得糖的分子量及产率不稳。因产率低，大多数壳聚糖都被浪费，造成原料浪费严重，成本过高。因此研制或改进新的生产技术工艺，是降低成本，提高产率，扩大应用范围的关键问题。

在 80 年代后期兴起的一项有机合成新技术，即——将微波辐射能技术取代传统加热方法应用于有机干、湿反应（合成）。有研究成果，如在 Diels—Alder 反应及其它成环反应的应用中，充分显示出了此新技术的广阔前景，其特点是反应快，产率高，受热均匀，产品质量均一。由于在微波场中进行化学反应时，是一种内加热反应形式，是离子迁移和极性分子的旋转使分子运动，而不会引起分子内部结构的改变，其使反应速度和选择性有极大的提高。在有机干、湿反应中微波的应用越来越广泛，使一些用常规加热方法很难进行的反应也找到了新的途径，且使一些不易发生反应的物质也变得活跃起来。然而，国内外对在电解质存在下微波降解壳聚糖制备寡糖、低聚糖尚未见报道。

(三) 技术内容

本发明的目的就是利用丰富的甲壳质资源，降解制备具有多种生物功能的低聚糖，使低聚糖广为社会所用，为人类造福。采用微波降解技术在电解质作用下对壳聚糖进行了降解，确定微波降解技术是将壳聚糖变为水溶性壳聚糖的一个很有效的途径，并使此方法能够降低能耗，减小污染，节省时间和原料，开发一个具有产业化前景和广泛市场潜力的应用技术。

本发明的任务是由以下技术方案完成的，研制了一种微波降解的甲壳低聚糖化合物：其是由微波辐射能在电解质存在下，降解壳聚糖制成的甲壳低聚糖化合物，该化合物的典型结构式为：



其中 n 为聚合度, $n=3\sim150$, $R=H$ 或 Ac , 分子量在 $600\sim30000D$ 之间。

所述的甲壳低聚糖是在电解质作用下微波降解制成的, 其中制备步骤如下:

(1) 称取定量的壳聚糖粉末;

(2) 按 1: 20~50 重量倍的比例, 向称量的壳聚糖加入电解质溶液, 将称量的壳聚糖溶解成粘稠液体;

(3) 将该粘稠液体, 搅拌均匀, 封盖后放于微波炉中, 再在一定的微波辐射能加热反应数分钟;

(4) 再将该反应物用 $2N$ 的 $NaOH$ 液中和至中性, 析出淡黄色絮状沉淀物, 再在 $4^{\circ}C$ 冷藏柜中沉化;

(5) 将上述沉化的淡黄色絮状沉淀物进行抽滤, 将所得滤饼在 $60^{\circ}C$ 下烘干;

(6) 将烘干物粉碎至 20~100 目, 进行分子量测定, 取分子量在 $600\sim30000D$ 之间的甲壳低聚糖作为甲壳低聚糖化合物的成品。

所述的 (2) 中的电解质溶液, 其是在稀酸中加入适量的电解质制成含电解质的酸溶液。

所述的电解质, 是: $NaCl$ 或 KCl 或 $CaCl_2$ 。

所述的 (3) 中微波辐射能量为 $480\sim800W$ 。

所述的 (3) 中含电解质的酸溶液中, 用微波辐射降解壳聚糖的反应时间为 $3\sim12min$ 。

所述的 (3) — (6) 步骤中含电解质的酸溶液中, 用微波辐射降解壳聚糖的所得产物的分子量, 其与电解质的酸溶液、微波辐射能量和时间三者之间有如下关系:

①在 $NaCl$ + 稀酸溶液、微波辐射能量 $480\sim800W$ 和时间 $3\sim12min$ 的作用下所得产物的分子量范围为: $2.01\times10^4\sim9.14\times10^3D$;

②在 KCl + 稀酸溶液、微波辐射能量 $480\sim800W$ 和时间 $3\sim12min$ 的作用下所得产物的分子量范围为: $1.87\times10^4\sim6.02\times10^3D$;

③在 $CaCl_2$ + 稀酸溶液、微波辐射能量 $480\sim800W$ 和时间 $3\sim12min$ 的作用下所得产物的分子量范围为: $1.65\times10^4\sim4.79\times10^3D$;

④在稀盐酸溶液、微波辐射能量 $480\sim800W$ 和时间 $3\sim12min$ 的作用下所得产物的分子量范围为: $4.63\times10^5\sim2.01\times10^5D$;

⑤在稀醋酸溶液、微波辐射能量 $480\sim800W$ 和时间 $3\sim12min$ 的作用下所得产物的分子量范围为: $4.73\times10^5\sim2.04\times10^5D$ 。

总之, 用含电解质的酸溶液在微波作用下降解壳聚糖所得产物的分子量范围, 远远小于纯酸溶液在微波作用下降解产物的分子量。

本发明的优点在于：由于微波辐射能量及其作用时间与含不同电解质的酸溶液种类，三者的相互作用、综合协同作用，使得降解壳聚糖是以内加热反应形式，而不是分子内部结构改变的反应。在微波辐射能量作用下的酸降解反应是以离子迁移和极性分子的旋转，来促使反应物间的分子运动；而且酸溶液中氢离子有一定的催化作用，促使壳聚糖溶解度加大，降解速度加快。实验证明：在醋酸和微波辐射能量作用下，所得降解物质—甲壳低聚糖的分子量大于由盐酸和微波辐射能量作用下，所得降解物质—甲壳低聚糖的分子量。这是与它们解离氢离子的能力有关，由于醋酸的解离速度要远远小于盐酸。在微波降解壳聚糖的反应中，加入电解质后，可以加强微波与水偶合，即加快了体系的升温速度，更快的产生过热现象，而且微波辐射能加剧极性分子的运动，大大增加了反应物的碰撞频率，因此在极低浓度的酸体系中，加入一些金属盐可促进反应的进行。实验证明：在微波降解壳聚糖反应中，盐效应并不会影响糖环的结构，反而使反应速度和选择性有极大地提高。因此，在微波降解壳聚糖的反应中加入电解质后，壳聚糖的降解速度加快了。

(四)、附图及其实施例

本发明的实施例结合附图进一步说明如下，本发明的保护范围不仅局限于以下实施例中。

图 1 为壳聚糖的红外谱图；

图 2 为含 NaCl 的酸溶剂作用下所得甲壳低聚糖的红外谱图；

图 3 为含 KCl 的酸溶剂作用下所得甲壳低聚糖的红外谱图；

图 4 为含 CaCl_2 的酸溶剂作用下所得甲壳低聚糖的红外谱图；

图 5 为纯酸溶剂作用下所得甲壳低聚糖的红外谱图；

图 6 为甲壳低聚糖的 ^1H NMR 图谱。

本发明的在电解质作用下的微波制备甲壳低聚糖技术方法如下：

准确称取适量壳聚糖粉末，用 30 倍的酸溶剂或含电解质的酸溶剂，使其溶解成粘稠液体，搅均，封盖，将反应器放入微波炉中，分别在 480~800W，3~12min 反应。反应完毕，冷至室温，用 2N 的 NaOH 液中和得淡黄色絮状沉淀；再在 4℃ 冷藏柜中沉化 30min，抽滤，所得沉淀在 60℃ 下烘干。将烘干物粉碎到 20~100 目，用乌氏粘度计测定分子量（测分子量的经典方法）。制备方法实施例如表 1~4：

表 1：480W 下反应 3~12min 所得产物的分子量。

实例号	时间 (min)	3	6	9	12
酸剂					
1	0.1MNaCl+2%HCl	2.01×10^4	1.92×10^4	1.69×10^4	1.17×10^4
2	0.1MKCl+2%HCl	1.87×10^4	1.76×10^4	1.43×10^4	1.01×10^4
3	0.05M CaCl_2 +2%HCl	1.65×10^4	1.57×10^4	1.24×10^4	9.28×10^3
4	2% HAc	4.74×10^5	4.52×10^5	4.27×10^5	3.79×10^5
5	0.1MNaCl+2% HAc	2.23×10^4	2.09×10^4	1.83×10^4	1.42×10^4
6	0.1MKCl+2% HAc	1.97×10^4	1.88×10^4	1.69×10^4	1.31×10^4
7	0.05M CaCl_2 +2% HAc	1.73×10^4	1.64×10^4	1.38×10^4	1.04×10^4

表 2：640W 下反应 3~12min 所得产物的分子量。

实例号	时间 (min)	3	6	9	12
酸剂					

8	2% HCl	4.23×10^5	3.97×10^5	3.62×10^5	3.16×10^5
9	0.1M NaCl + 2% HCl	1.94×10^4	1.76×10^4	1.45×10^4	1.02×10^4
10	0.1M KCl + 2% HCl	1.69×10^4	1.52×10^4	1.21×10^4	9.13×10^3
11	0.05M CaCl_2 + 2% HCl	1.51×10^4	1.43×10^4	1.12×10^4	8.97×10^3

表 3: 800W 下反应 3~12min 所得产物的分子量。

实例号	时间 (min) 酸剂	3	6	9	12
12	2% HCl	3.89×10^5	3.42×10^5	2.89×10^5	2.10×10^5
13	0.1M NaCl + 2% HCl	1.72×10^4	1.43×10^4	1.14×10^4	9.14×10^3
14	0.1M KCl + 2% HCl	1.49×10^4	1.13×10^4	8.73×10^3	7.92×10^3
15	0.05M CaCl_2 + 2% HCl	1.37×10^4	1.03×10^4	8.01×10^3	6.79×10^3

表 4: 不同微波能量下在 12 分钟时所得产物的分子量

实例号	微波能量 (W) 酸剂	480	640	800
16	2% HCl	3.41×10^5	3.16×10^5	2.10×10^5
17	0.1M NaCl + 2% HCl	1.17×10^4	1.02×10^4	9.14×10^3
18	0.1M KCl + 2% HCl	1.01×10^4	9.13×10^3	7.92×10^3
19	0.05M CaCl_2 + 2% HCl	9.28×10^3	8.97×10^3	6.79×10^3

本发明的在电解质作用下、微波制备的甲壳低聚糖谱图分析:

参见图 1~5 可知, 红外光谱的主要基团峰为: 3410cm^{-1} 左右为 O—H、N—H 的伸缩振动峰, 2924cm^{-1} 左右为 C—H 的伸缩振动峰, 1623cm^{-1} 、 1513cm^{-1} 左右为 N—H 的变角振动, 分子较大, 使得它的三个峰重叠而分为两个峰, 1088cm^{-1} 左右为 C—N 的吸收峰 (因此峰很强, 因此不是 C—C 吸收峰), 651cm^{-1} 左右的峰也为 NH_2 的峰, 证明 NH_2 基团并未被破坏, 1380cm^{-1} 左右为 C—H 的变形振动, 1248cm^{-1} 左右为 O—H 的面内变形振动, 1153cm^{-1} 左右为 C—O—C 吸收峰, 895cm^{-1} 左右为 β —端基差向异构的 C—H 变角振动, 证明微波并未破坏多糖的环状结构。并由谱图可知, 在溶剂中加入 KCl、NaCl、 CaCl_2 电解质进行壳聚糖降解反应, 盐效应并不会影响糖环的结构。所谓盐效应的含义是在弱电解质溶液中, 加入与弱电解质没有相同离子的强电解质, 而使弱电质的离解度略微增大的效应, 称为盐效应。盐效应的产生机理, 是由于强电解质的加入, 使溶液中离子间的相互牵制作用增强, 离子结合成分子的机会减少, 降低了分子化的程度, 因而达到平衡时, 弱电质的离解度比未加入强电解质时略微大些。结合本案例中, 壳聚糖是弱电解质, 所加的 NaCl 等为强电解质。弱电解质是不能完全电离的, 而强电解质可发生完全电离。从实施例的红外谱图中发现: 降解产物甲壳低聚糖与壳聚糖的红外谱图一致, 这证明糖环结构并未破坏, 而且由降解产物甲壳低聚糖的红外谱图可以看出, 不管加入何种电解质以及各电解质的离子强度有多大, 在各红外谱图中主要峰的位置几乎一致, 说明峰位置与加入电解质的种类无关, 与各电解质的离子强度大小也无关。

本发明的甲壳低聚糖的核磁谱图分析, 见图 6: 图中 2.04 ppm 的基团峰是由于乙酰氨基未脱干净, 其上的甲基峰; 其他氢 ($\text{H}_2 \sim \text{H}_6$) 的基团峰主要在 3.2~4.2ppm。如表 5: 甲壳低聚糖中氢的位移

H_1	H_2	H_3	H_4	H_5	H_{6a}	H_{6b}
5.49	3.76	4.13	3.98	3.87	3.23	3.29

说明书附图

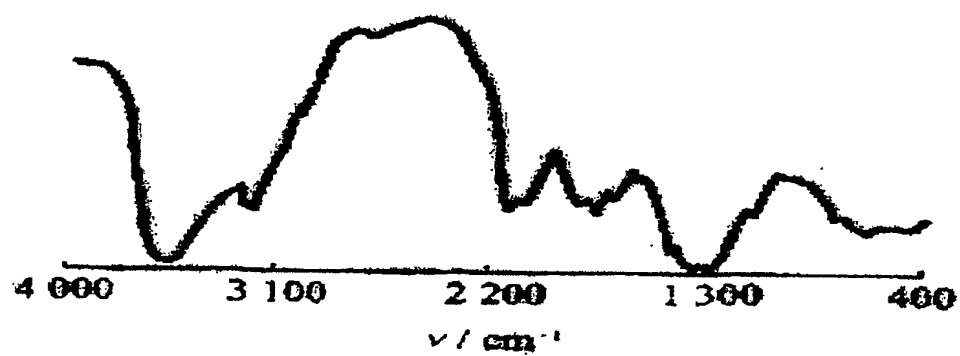


图 1

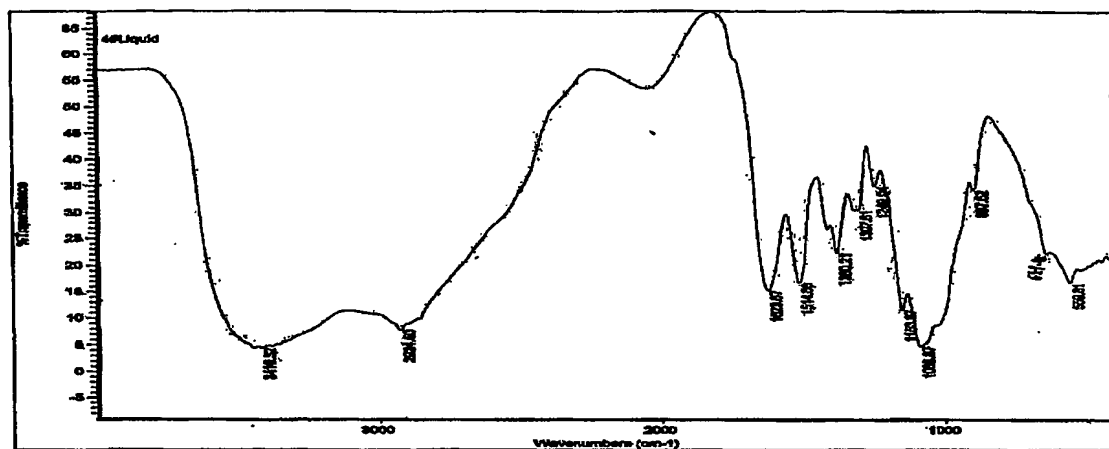


图 2

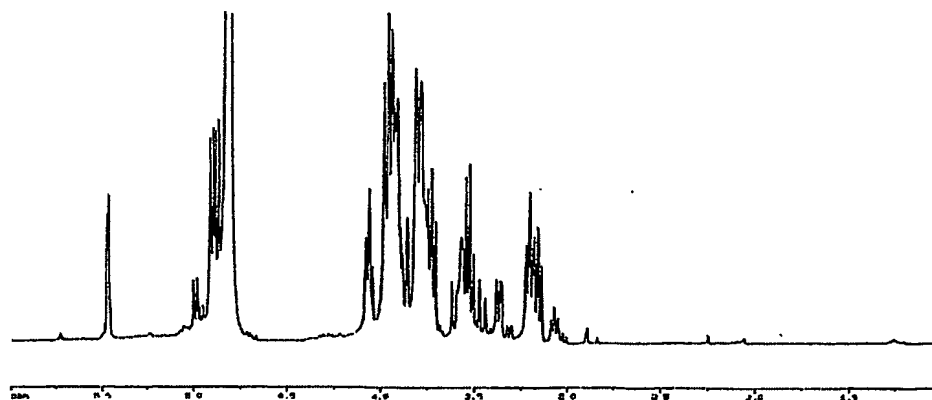


图 6

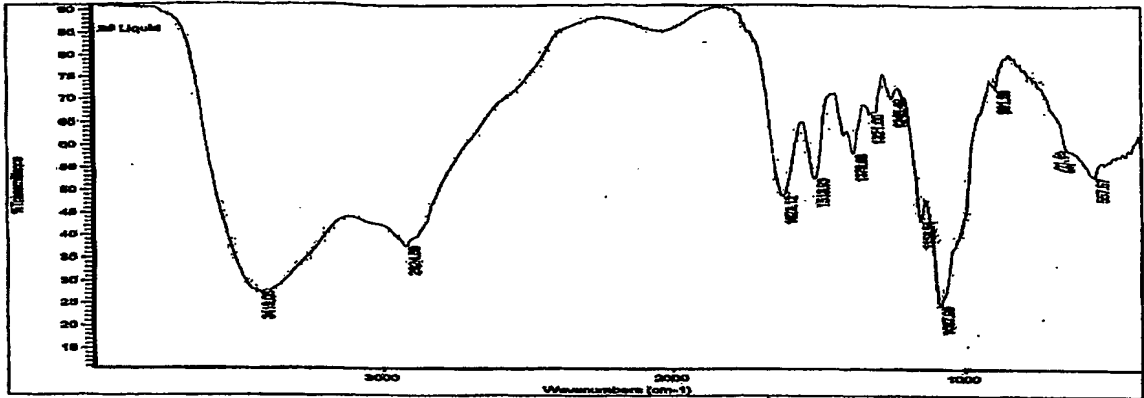


图 3

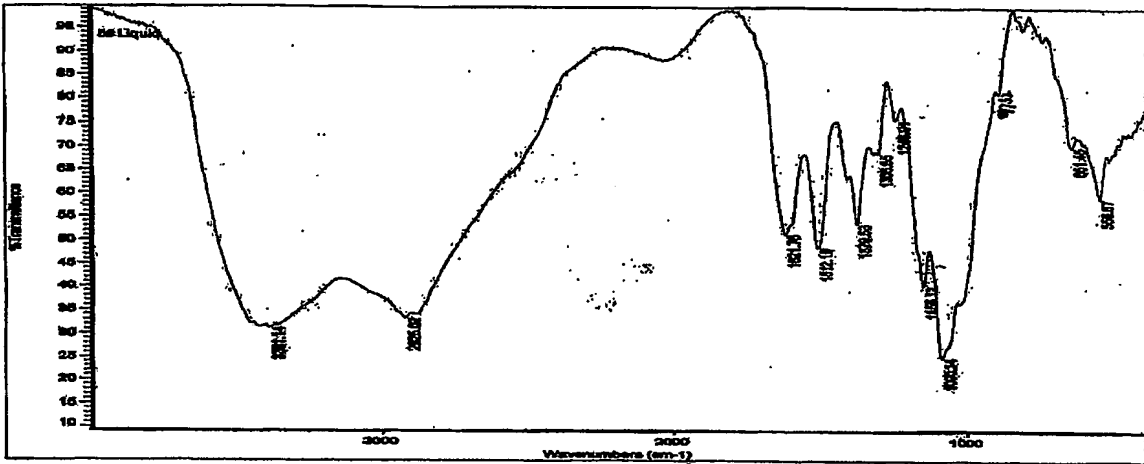


图 4

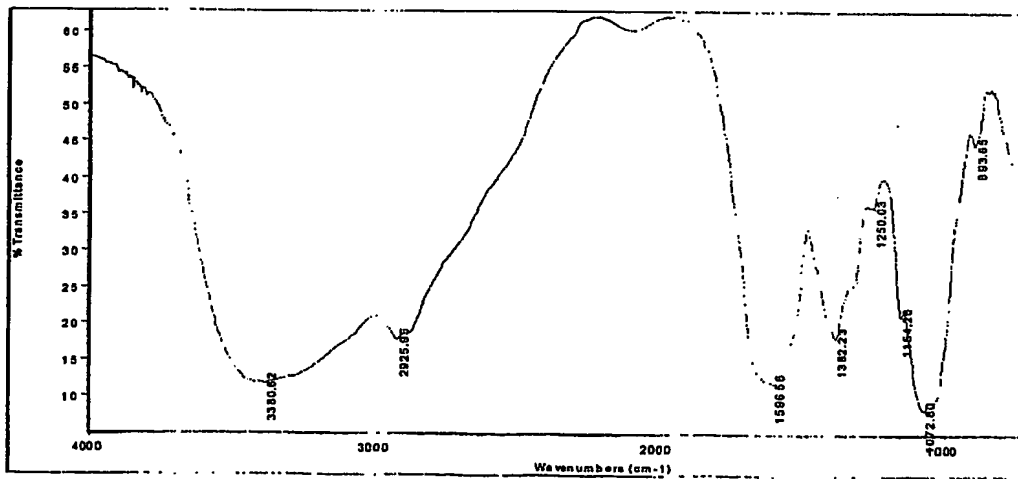


图 5